动 物 学 研 究 2004, Oct. 25 (5): 415-421 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

扬子鳄MHC Ⅱ类B基因第二外元的克隆及序列分析

史 燕，吴孝兵*，晏 鹏，陈壁辉
(安徽师范大学 生命科学学院，重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室，安徽 芜湖 241000)

摘要：3头扬子鳄血样取自宣城安徽省扬子鳄繁殖研究中心。利用一对简并引物对MHC Ⅱ类B基因第二外元的部分片段进行扩增；通过克隆、单链构象多态性分析、测序，并将测得序列与下载的8个物种MHC序列比对，确定序列差异和变异位点；利用MEGA软件构建NJ树，PAUP4.0构建MP树。结果得到10种不同的序列，片段长166 bp。核苷酸序列中有38个变异位点，氨基酸序列中有23个变异位点；推定的抗原结合位点非同义替换（d_N）明显高于同义替换（d_S）。10种序列的NJ树和MP树极为相似，均为A、B两个分支，两个分支明显的特异性位点核苷酸序列中有9个，氨基酸序列中有7个。表明扬子鳄MHC Ⅱ类B基因第二外元有较高的多态性，有利于扬子鳄饲养种群的遗传保护。

关键词：扬子鳄；MHC Ⅱ类B基因第二外元；序列分析
中图分类号：Q959.64 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2004)05-0415-07

Cloning and Sequences Analysis of the Second Exon of MHC Class Ⅱ B Genes in Chinese Alligator, *Alligator sinensis*

SHI Yan, WU Xiao-bing*, YAN Peng, CHEN Bi-hui
(*Conservation and Utilization of Important Biological Resources of Anhui Key Laboratory, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China*)

Abstract: A pair of degenerate primers were used to amplify polymorphic segments of the second exon of MHC class Ⅱ B genes from the genomic DNA of *Alligator sinensis*. Sequences were obtained from cloning, single strand conformation polymorphism analysis and sequencing. By comparing with another eight species MHC sequences, differences from sequences and variable sites were confirmed. Phylogenetic relationships were constructed by neighbor-joining method in MEGA and maximum parsimony method in PAUP4.0. Ten different nucleotide sequences were obtained, which were 166 bp long (except one 160 bp). There are 38 variable sites among ten nucleotide sequences and 23 variable sites among amino acid sequences. The number of nonsynonymous (d_N) substitutions of pABS was higher than that of synonymous (d_S) substitutions. The ten nucleotide sequences can be clustered into two clades (group A and B) in NJ and MP phylogenetic trees. Some specific sites were found between the two groups, including 9 nucleotide sites and 7 amino acid sites. The high polymorphism of MHC class Ⅱ B genes in *A. sinensis* was of great benefit to genetic conservation in the captive population of *A. sinensis*.

Key words: *Alligator sinensis*; The second exon of MHC class Ⅱ B genes; Sequences analysis

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）基因是在脊椎动物中发现的高度多态的基因群，是抵抗寄生虫的主要遗传基因，在脊椎动物免疫系统中起着重要作用（Apanius et al, 1997; Edwards & Hedrick, 1998; Hedrick & Kim, 1999）。在已被广泛研究的各类MHC基因中，Ⅱ类B基因的第二外元编码的抗原结合位点（antigen-binding sites, ABS）的多态性较高。MHC

收稿日期：2004-04-08；接受日期：2004-08-18
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30270213）；安徽省自然科学基金资助项目（01043501）；安徽省优秀青年基金资助项目（04043049）；重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室基金资助项目；安徽省学术与技术带头人专项基金资助项目
* 通讯作者（Cresponding author），E-mail：wuxb@mail.ahnu.edu.cn

基因作为一种遗传标记，可运用于种群遗传结构和变异性的研究，为更好地保护濒危物种起到一定作用（Hedrick et al，2001）。

扬子鳄 （*Alligator sinensis*）是我国特有的珍稀野生动物和世界上最濒危的鳄类之一。为了更好地保护扬子鳄种群，必须了解其种群遗传结构。从RAPD及线粒体控制区多态性研究结果表明现存的扬子鳄饲养种群中遗传变异较低（Wu et al，2002；Wang et al，2003）。而扬子鳄MHC Ⅱ类B基因第二外元区域的多态性如何，这是本研究拟探讨的问题。

1 材料与方法

1.1 DNA提取及PCR扩增

实验用3头扬子鳄（1号、3号为♂，2号为♀）来自宣城安徽省扬子鳄繁殖研究中心。用一次性注射器抽取少量血液并冷冻，带回实验室后保存于-80 ℃冰箱中。采用标准的酚/氯仿抽提方法（Sambrook et al，1989）提取基因组DNA。用于PCR扩增扬子鳄MHC Ⅱ类B基因第二外元的简并引物是本实验室根据其他动物的序列比对，并参考了Edwards et al（1995）的引物而设计的［MHC-UP：5′-AAGG（T/G/C）C（C/G）AGTG（T/C）TACT（T/A）（C/T）A（T/G/C）（T/G/C）A ACGG-3′和MHC-DP：5′-TAGTTGTG（C/G）C（G/T）GCAG（A/T）A（C/G）GTGTC-3′］。PCR反应程序为：94 ℃预变性2 min；94 ℃变性30 s，52 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共38个循环；然后72 ℃延伸30 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳分离，切胶，用DNA凝胶回收试剂盒（Vitagene公司）回收纯化。

1.2 克隆及测序

纯化后的DNA经连接（连接载体是pUCm-T）、转化入大肠杆菌DH5α菌株。平板上长出菌落后，利用蓝白斑和菌落PCR方法筛选出阳性克隆。阳性克隆经SSCP（single strand conformation polymorphism）分析检测出所有差异片段，并将菌液送上海申友生物技术公司进行测序。

1.3 序列和数据分析

从GenBank上下载8个物种的12个MHC序列。密河鳄（*Alligator mississippiensis*）：Almi10（U24402）、Almi15（U24403）、Almi7（U24404）；凯门鳄（*Caiman crocodilus*）：Cacr51（AF256651）、Cacr52（AF256652）、Cacr61（AF277661）；原鸡（*Gallus gallus*）：chick（X07447）；红翅黑鹂（*Agelaius phoeniceus*）：blackbird（AF030997）；爪蟾（*Xenopus lavies*）：Xela（D50037）；人（*Human species*）：HLA（AJ420288）；牛（*Bos taurus*）：cow（M30010）；斑马鱼（*Danio rerio*）：zebrafish（U08870）。将测序得到的序列与所有下载序列一起用Clustal X软件（Thompson et al，1997）进行序列比对，确定序列差异和变异位点。序列中每个位点的同义（d_S）和非同义（d_N）替换数通过MEGA 2.1软件（Kumra et al，2001）计算。位点选择根据人的HLA Ⅱ类分子中组成ABS的24个密码子（Brown et al，1993），以及扩增出的其他非ABS序列。利用MEGA软件中基于Kimura双参数模型的邻接法（neighbor-joining，NJ）构建物种内不同序列间及与其他不同物种间的系统发生树。同时利用PAUP4.0（phylogenetic analysis using parsimony）软件（Swofford，1998）中最大简约法（maximum parsimony，MP），使用启发式搜索算法（heuristic search）构建最大简约树。

2 结果与分析

2.1 测序结果

从3个样本中共筛选出53个阳性克隆，经SSCP分析检测出18条阳性克隆片段。经测序后得到10种不同的序列（图1），另8种为同一种序列的重复（由简并引物引起的SSCP分析差异）。由于爬行类近缘物种MHC序列都未定基因座位，所以10种序列的命名只参照惯例，取拉丁文前两个字母，分别命名为Alsi-1—Alsi-10。其中除Alsi-8为160 bp（有6个碱基缺失）外，其余9种序列长度为166 bp。该10个序列已送GenBank，检索号为AY491421—AY491430。

2.2 序列分布及差异分析

阳性克隆中各种序列的数量分布及其比例见表1。每个样本都出现多种序列，并且样本间存在序列重复现象。在1和2号个体中都分别克隆得到5种不同的MHC Ⅱ类B基因第二外元序列，而在3号个体中则得到了6种不同的序列（表1）。Alsi-1序列在3个个体中均有分布，克隆数比例最高。

所有序列共包括38个变异位点，占23%。其中转换17个，颠换16个，既有转换也有颠换5个。发生在密码子第1、2、3位点的替换分别为14、

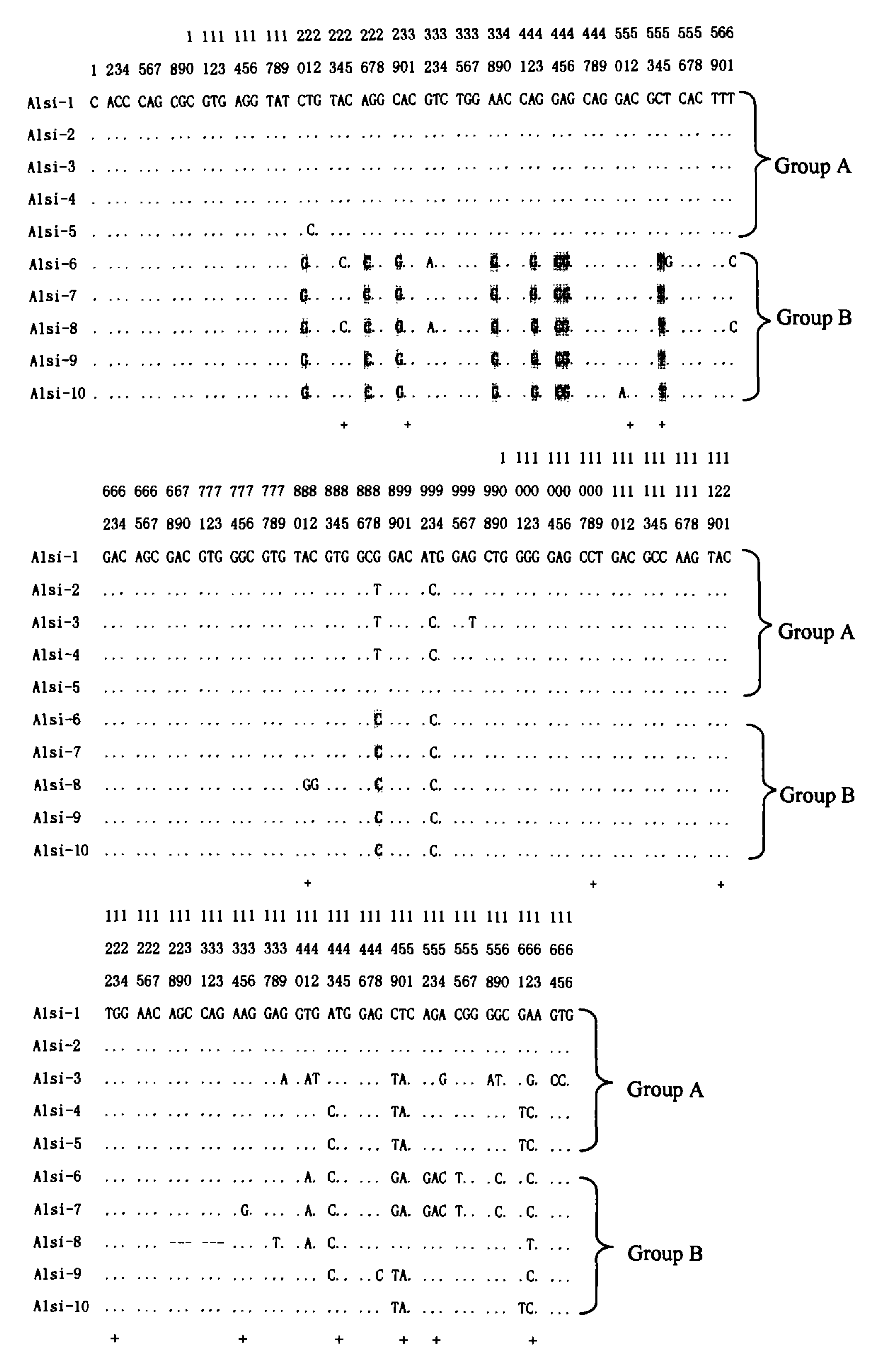


图 1　扬子鳄 MHC Ⅱ类 B 基因第二外元的 10 种核苷酸序列

Fig. 1　Ten nucleotide sequences of the second exon of MHC class Ⅱ B genes in three *Alligator sinensis individuals*

阴影部分表示 Group B 序列的特异位点，+表示推测的抗原结合位点（pABS）。

Shadowed boxes indicate the specific sites of group B sequences, + indicates putative antigen-binding sites.

表 1　扬子鳄 MHC Ⅱ类 B 基因第二外元各序列占阳性克隆的比例

Table 1　Percentage of the second exon of MHC class Ⅱ B gene sequences in positive clones of *Alligator sinensis*

个体编号 Code of individual	序列代码 Code of sequences	阳性克隆数 No. of positive clones	序列占阳性克隆比例 Percentage of sequences in positive clone (%)
1, 2, 3	Alsi-1	13	24.5
3	Alsi-2	4	7.5
3	Alsi-3	3	5.7
1, 2	Alsi-4	6	11.3
2	Alsi-5	2	3.8
2, 3	Alsi-6	4	7.5
3	Alsi-7	3	5.7
1, 3	Alsi-8	10	18.9
1	Alsi-9	3	5.7
1, 2	Alsi-10	5	9.4

15和9个，共有27个非同义替换，造成23个氨基酸的改变（图2），占全部55个氨基酸的41.8%。10种序列的碱基差异从1.3%到19.2%，平均为10%；氨基酸差异从1.9%到39.6%，平均为20.9%。推测扬子鳄 MHC Ⅱ类 B 基因第二外元序列应包括14个 pABS（putative-ABS）密码子和41个非 pABS。14个 pABS 中10个有变异，占71.4%；而非 pABS 密码子中有13个有变异，占31.7%。各个位点的非同义替换和同义替换之比（d_N/d_S）均大于1，特别是 pABS 位点的非同义（d_N）替换明显高于同义（d_S）替换，两者之比值（d_N/d_S）达4.48（表2）。

2.3　系统树构建结果

根据 NJ 法构建的10种序列的系统树明显分为 A、B 两支（图3），分支 A 包括 Alsi-1—Alsi-5，分支 B 包括 Alsi-6—Alsi-10。在两个分支间存在一些明显的特异性位点，如核苷酸序列中的特异性位点为20、26、29、38、42、44、45、54、88（图1中阴

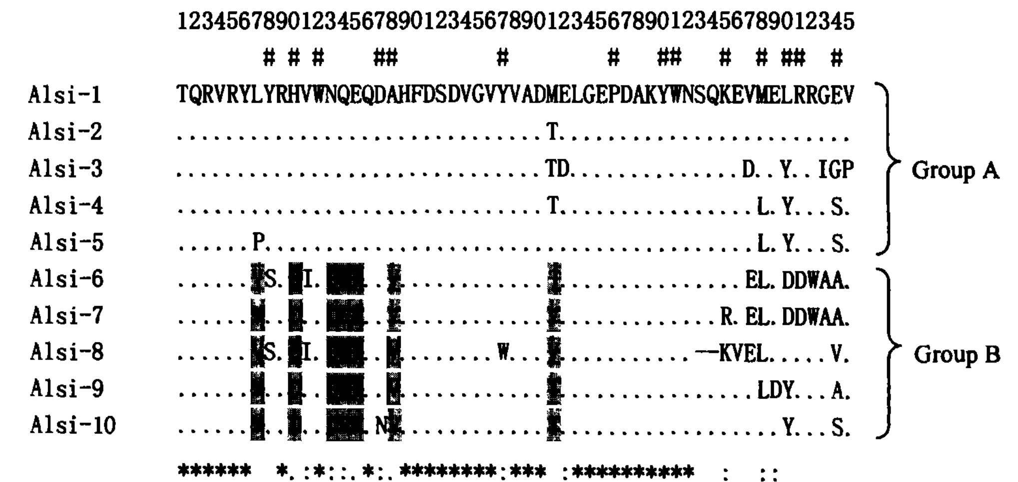


图 2　扬子鳄 MHC Ⅱ B 基因第二外元的氨基酸序列

Fig.2　Amino acid sequences of the second exon of MHC calss Ⅱ B genes in *Alligator sinensis*

*表示序列一致的位点；"." 和 ":" 分别表示氨基酸理化性质轻度保守和高度保守；# 表示推测的抗原结合位点，阴影部分表示 Group B 序列的特异位点。

Asterisks indicate the conserved sites of sequences; "." and ":" indicate amino acid substitutions leading to weak conservation and strong conservation of physiochemical properties respectively; # indicate putative antigen-binding sites. Shadowed boxes indicate the specific sites of group B sequences.

表 2　扬子鳄 MHC Ⅱ类 B 基因第二外元推测的抗原结合（pABS）位点和非 pABS 位点的同义（d_S）和非同义（d_N）替换数（Mean ± *SE*）

Table 2　Synonymous（d_S）and nonsynonymous（d_N）substitutions of putative antigenbinding sites（pABS）and non pABS in the second exon of MHC class Ⅱ B genes of *Alligator sinensis*（Mean ± *SE*）

位点 Position	密码子数 No. of codons	d_N	d_S	d_N/d_S
推测的抗原结合位点 pABS	14	0.233 ± 0.083	0.052 ± 0.042	4.48
非 pABS Non pABS	41	0.077 ± 0.022	0.072 ± 0.043	1.07
所有位点 All sites	55	0.112 ± 0.030	0.067 ± 0.032	1.67

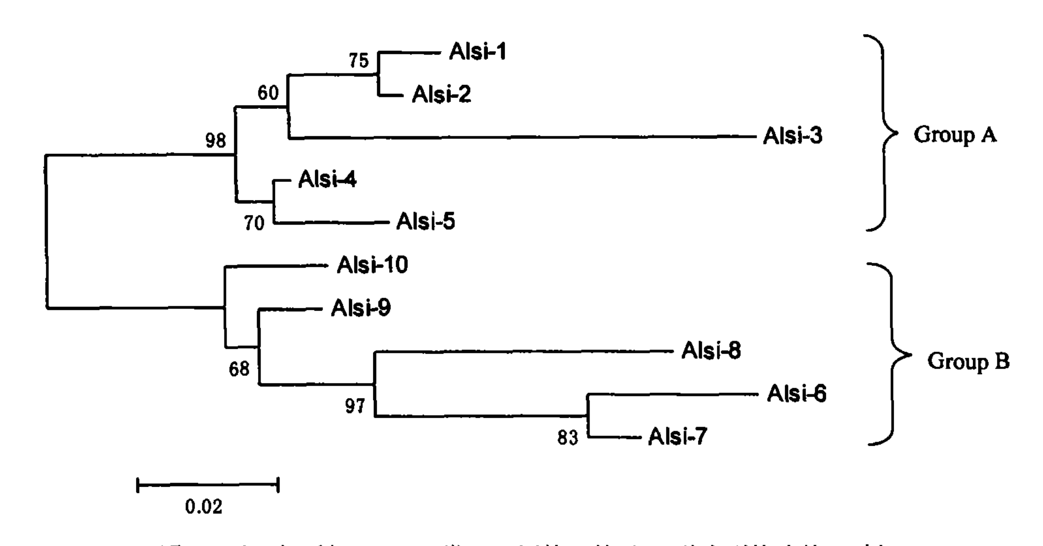


图 3　基于扬子鳄 MHC Ⅱ类 B 基因第二外元 10 种序列构建的 NJ 树

Fig. 3　Phylogenetic relationships among ten sequences of the second exon of MHC class Ⅱ B genes in *Alligator sinensis* constructed by neighbor-joining method

分支上的数字为自引导值，重复次数为 1 000 次。

Bootstrap values from 1 000 iterations were indicated on the branches.

影部分），氨基酸序列中的特异性位点为 7、10、13、14、15、18、31（图 2 中阴影部分）。分支 A 包含两个亚支，其中 Alsi-1 和 Alsi-2 序列较近，核苷酸和氨基酸序列相似性分别达 98.7%、98%；Alsi-4 和 Alsi-5 序列分别达 98.1% 和 96%；Alsi-3 与其他序列的差异较大。而分支 B 中 Alsi-6、Alsi-7 和 Alsi-8 序列相似性较高，而 Alsi-9 和 Alsi-10 与其他差异较大。

用 NJ 法构建的扬子鳄与其他鳄类、鸟类、哺乳类和鱼类的 MHC 序列系统进化树显示：鳄类序列明显聚成一类（图 4），自引导值达 96；同时扬子鳄的 B 分支与凯门鳄的 Cacr61、Cacr51 两种序列同聚为一支；而密河鳄 3 种序列（Almi7、Almi10、Almi15）及另一种凯门鳄序列 Cacr52 与扬子鳄两个分支的序列差异较大。另外还发现，鳄类与鸟类的亲缘关系最近，再依次是两栖类、哺乳类。用 PAUP 软件中的 MP 法构建的系统树与此极为相似。

3　讨　论

本研究从 3 个个体得到 10 种不同的 MHC Ⅱ类 B 基因第二外元序列，表明扬子鳄 MHC Ⅱ类 B 基因存在着高度的多态性，并且无明显的个体和性别差异。这与鳄类其他物种的研究结果相似。Edwards et al（1995）从 1 条密西西比鳄的 3 个克隆中，就获得了 3 种不同的 MHC 基因序列；从 GenBank 中获得的凯门鳄 MHC Ⅱ类基因的序列亦有 3 种。

在热带地区寄生虫给寄主造成的选择压力比其他地区高得多，这使抗原的选择压力增加，因此 MHC 基因多态性维持较高水平（Westerdahl et al, 2000）。扬子鳄 MHC 基因的高度多态性也体现其受到的选择压力较大，这与其他一些濒危动物有所不同，一些濒危物种的 MHC 基因多态性较低，对传染性疾病和寄生虫较敏感（Edwards & Potts, 1996;

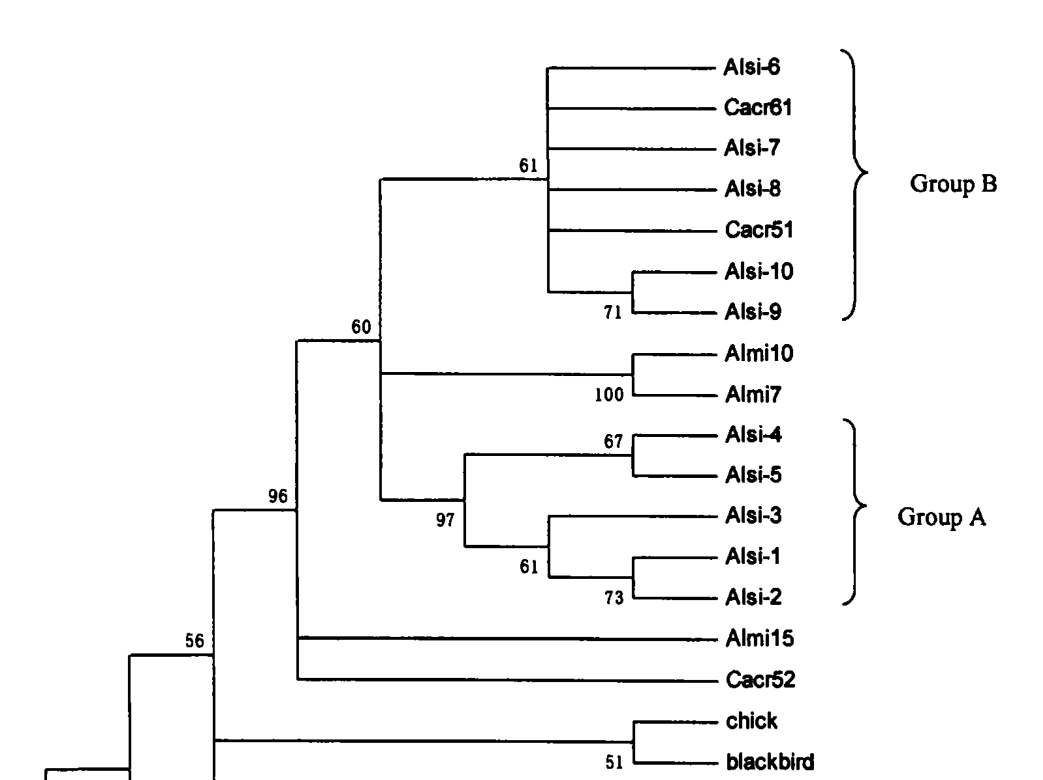


图4 基于MHC Ⅱ类B基因第二外元序列构建的9个物种的NJ树

Fig.4 Phylogenetic relationships among 9 species based on the second exon of MHC class Ⅱ B genes constructed by neighbor-joining method

分支上的数字为自引导值，重复次数为1 000次。

Bootstrap values from 1 000 iterations were indicated on the branches.

Hedrick & Kim, 1999)。扬子鳄MHC Ⅱ类B基因第二外元较高的多态性，将有利于扬子鳄饲养种群的遗传保护，尤其是在野生扬子鳄种群日益减少、饲养种群的遗传多样性减少的情况下。

参考文献:

Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK. 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex [J]. *Crit. Rev. Immunol.*, **17**: 79-224.

Brown JH, Jardetsky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1993. Three-dimensional structure of the human class Ⅱ histocompatibility antigen HLA-DR1 [J]. *Nature*, **364**: 33-39.

Edwards SV, Potts WK. 1996. Polymorphism of genes in the major histocompatibility complex: Implications for conservation genetics of vertebrates [A]. In: Smith TB, Wayne RK. Molecular genetic approaches in conservation [C]. London: Oxford University Press. 214-237.

Edwars S, Hedrick PW. 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: From genomics to sexual selection [J]. *Trends Ecol. Evol.*, **13**: 305-311.

Edwards SV, Grahn M, Potts WK. 1995. Dynamics of MHC evolution in birds and crocodilians: Amplification of class Ⅱ genes with degenerate primers [J]. *Moleclar Ecology*, **4**: 719-729.

Hedrick PW, Kim TJ. 1999. Genetics of complex polymorphisms: Parasites and maintenance of MHC variation [A]. In: Evolutionary Genetics From Molecules to Morphology Singh RS, Krimbas CK [M]. New York: Cambridge University Press.

Hedrick PW, Gutierrez-Espeleta GA, Lee RN. 2001. Founder effect in an island population of bighorn sheep [J]. *Molecular Ecology*, **10**: 851-857.

Kumra SK, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, **17**: 1244-1245.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning [A]. A Laboratory Manual, 2nd ed [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 463-468.

Swofford DL. 1998. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4.0 [CP]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 4876-4882.

Wang YQ, Zhu WQ, Wang CL. 2003. D-loop sequence variation of mitochondrial DNA in captive Chinese alligator [J]. *Acta Genetica Sinica*, **30** (5): 425-430. [王义权，朱伟铨，王朝林. 2003. 扬子鳄饲养种群线粒体 DNA 控制区的序列多态性. 遗传学报，**30** (5): 425-430.]

Westerdahl H, Wittzell H, Schantz TV. 2000. MHC diversity in two passerine birds: No evidence for a minimal essential MHC [J]. *Immunogenetics*, **52**: 92-100.

Wu XB, Wang YQ, Zhou KY, Zhu WQ, Nie JS, Wang CL, Xie WS. 2002. Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Biological Conservation*, **106**: 435-441.

《云南鸟类志》评介 2

云南鸟类志分上、下两卷。《云南鸟类志·上卷·非雀形目》由中国科学院昆明动物研究所研究员杨岚等编著，全书共 673 页，附有彩色图 4 版，已于 1994 年由云南科技出版社出版发行；《云南鸟类志·下卷·雀形目》由杨岚、杨晓君等编著，全书共 1056 页，彩色图 4 版，于 2004 年 8 月也由云南科技出版社出版发行。这是我国鸟类学研究的一件大喜讯。

众所周知，由于云南省的自然地理条件特殊，物种多样性十分丰富，鸟类区系组成相当复杂，种数之多居全国各省、区之冠。所以国内外学者对云南鸟类的研究，一直非常关注。

《云南鸟类志》的编写内容，包括总论和各论两大部分。总论部分：在上卷写有云南鸟类调查研究历史，云南鸟类资源及其评价，云南非雀形目鸟类分布名录总表和鸟体形态常用术语及测量方法图注等四个部分；下卷写有云南鸟类的区系特征及其演化趋势的探讨，云南鸟类地理分布及其垂直分布的特点，云南鸟类地理区划和云南鸟类分布名录总表等部分。

各论部分，按郑作新（1987、1994、2000）的分类系统，各分类阶元均编有检索表，目和科下扼要记有分类概况、形态特征、生态和地理分布概述。上卷记述非雀形目鸟类 316 种，另 53 亚种，分隶于 18 目 41 科；下卷除有 24 种为上卷非雀形目的补遗外，共记述雀形目鸟类 508 种，另 177 亚种，分隶于 28 科另 4 亚科。即上下两卷共记录云南鸟类 848 种，另 226 亚种，隶属于 19 目 69 科、另 4 亚科。是目前记述云南鸟类最为完善的一部专著。

每种的记述包括中文名、拉丁学名、俗名、英文名，种的原始文献，鉴别特征，亚种分化，在云南省境内的采集地和采集时间，依据标本描记雌雄成鸟和幼鸟的形态特征，地理分布，分类讨论和生态生物学资料等。这些内容除总结了百多年来中外学者对云南鸟类的研究成果之外，还主要包括了中国科学院昆明动物研究所建所 45 周年以来，对云南省鸟类进行系统调查研究积累的非常丰富而宝贵的第一手资料。如前后在云南境内发现的一些新亚种和全国鸟种新纪录；在编写过程中，还订正了黑领噪鹛、斑胸噪鹛、画眉、北灰鹟、白喉扇尾鹟和纹胸织布鸟等 6 种和亚种；对云南鸟类的分布型和地理区划（三级区划）也进行了研究。因此，可以说《云南鸟类志》是云南省鸟类研究至现阶段最新、最全面、最系统的总结，具有较高的学术价值。该志书的出版，将对鸟类的分类、分布、自然地理区划、种群生态学、行为学、保护生物学和自然疫源疾病的防除、珍稀濒危物种的保护与合理开发利用，以及观鸟旅游等诸多方面，有重要的参考和应用价值，是对我国鸟类学研究的重大贡献。

中国动物学会鸟类学分会副理事长
四川农业大学教授 李桂垣

2004 年 8 月